第 37 卷第 2 期　　生　态　学　报　　Vol.37,No.2
2017 年 1 月　　ACTA ECOLOGICA SINICA　　Jan.,2017

DOI: 10.5846/stxb201508021630
邓家军,张仕祥,张富生,张艳玲,胡锋,李辉信.烟草幼苗根系分泌自毒物质种类及 PAEs 对根系抗氧化性能的影响.生态学报,2017,37(2):495-504.
Deng J J, Zhang S X, Zhang F S, Zhang Y L, Hu F, Li H X. Autotoxins exuded from roots and the effects of PAEs on antioxidant capacity in roots of tobacco seedlings. Acta Ecologica Sinica,2017,37(2):495-504.

烟草幼苗根系分泌自毒物质种类及 PAEs 对根系抗氧化性能的影响

邓家军[1,2],张仕祥[3],张富生[2],张艳玲[3],胡　锋[1],李辉信[1,*]
1 南京农业大学资源与环境科学学院土壤生态实验室,南京　210095
2 江西省农产品质量安全检测中心,南昌　330046
3 中国烟草总公司郑州烟草研究院,郑州　450001

摘要: 采用 GC-MS 技术鉴定水培烟草 Burley 及 K326 在幼苗期不同生长阶段的根系分泌物;并用不同浓度邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二异辛酯(DIOP)溶液浇灌盆栽烟草幼苗,研究其根系抗氧化性能变化。结果如下:(1)Burley 根系分泌物主要有 3 类化合物,其中自毒物质邻苯二甲酸酯(PAEs)在二叶龄期、四叶龄期、六叶龄期的相对含量分别为 7.6%、0.3%、未检出;而 K326 根系分泌物主要有 9 类化合物,PAEs 在二叶龄期、四叶龄期、六叶龄期的相对含量分别为 35.6%、51.3%、2.2%。(2)浓度高于 0.1 mmol/L 的 PAEs 使根中超氧阴离子自由基产生的速率显著($P<0.05$)增加;随着 DIOP 及 DBP 浓度的增加,超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活性增加,在 0.5 mmol/L 时达到最大,然后随着处理浓度的增加而下降。丙二醛的浓度随着这两种 PAEs 处理浓度的增加而增大。结果表明:烟草根系分泌的自毒物质 PAEs 达到 0.5 mmol/L 时,能降低根系的抗氧化性能,造成根尖细胞膜系统的氧化损伤,引起根吸收功能等一系列生理生化变化,并最终表现出自毒作用。

关键词: 烟草;根系分泌物;自毒物质;抗氧化酶活性

Autotoxins exuded from roots and the effects of PAEs on antioxidant capacity in roots of tobacco seedlings

DENG Jiajun[1,2], ZHANG Shixiang[3], ZHANG Fusheng[2], ZHANG Yanling[3], HU Feng[1], LI Huixin[1,*]
1 *Soil Ecology Laboratory, College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing* 210095, *China*
2 *Testing Center of Agro-Product Quality and Safety of Jiangxi Province, Nanchang* 330046, *China*
3 *Zhengzhou Tobacco Research Institute, China National Tobacco Corporation, Zhengzhou* 450001, *China*

Abstract: Root exudates of two varieties (Burley and K326) of tobacco seedlings cultured in a hydroponic medium were collected, and identified using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Further, the effects of different concentrations of dibutyl phthalate (DBP) and diisooctyl phthalate (DIOP) on root antioxidant capacity were assessed using pot culture experiments. The results revealed three main compounds in Burley root exudates. The relative content of autotoxin phthalate esters (PAEs) at the two-, four-, and six-leaf stages were 7.6%, 0.3%, and not detected, respectively. However, there were nine main compounds in K326 root exudates. The relative PAE content at the two-, four-, and six-leaf stages were 35.6%, 51.3%, and 2.2%, respectively. PAEs such as DIOP and DBP were identified as the major autotoxins in root exudates of both tobacco seedlings. The rate of superoxide anion radical generation in roots significantly increased at

基金项目: 中国烟草总公司郑州烟草研究院科学技术合作项目(YKJSS201101)
收稿日期: 2015-08-02;　**网络出版日期:** 2016-06-13

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: huixinli@njau.edu.cn

concentrations greater than 0.1 mmol/L DIOP and DBP ($P < 0.05$). Both superoxide dismutase and catalase activities increased with increasing DIOP concentrations, with a peak at 0.5 mmol/L, and subsequently decreased at higher concentrations. Accumulated malondialdehyde concentrations increased with increasing DIOP and DBP concentrations, and the magnitude of malondialdehyde content was DIOP > DBP, which indicated the order of their toxic effect. Finally, our findings also revealed that when PAEs reached 0.5 mmol/L, they decreased the antioxidant capacity of the root system, initiated oxidative damage of the root cell membrane system, and caused a further decrease in root absorption and mineral metabolism, and thereby led to autotoxicity in the tobacco plants.

Key Words: tobacco; root exudates; autotoxins; antioxidant enzyme activity

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)属于茄科(Solanaceae),烟草属(Nicotiana)植物,是我国重要的经济作物之一。但随着耕地面积减少,加之种植制度、经济效益等因素影响,我国烟草连作问题相当突出。烟草长期连作,其根系分泌的某些物质在土壤中累积到一定浓度时,会对作物本身产生毒害[1-2],这就是烟草的自毒作用。自毒作用直接危害植株正常的生长发育,使烟叶产量及品质下降[3-4],是烟草产生连作障碍的主要原因之一。

植物的自毒作用通常发生在幼苗阶段,因为幼苗很脆弱,容易受到自毒物质的影响[5]。目前,直接评价植物自毒作用的文献较少:Jia 等[6]研究了连作烟草产生的自毒物质对种子活力、幼苗根系活力、根系的长度及数量、幼苗高度及生物量的影响。Sun 等[7]研究了番茄的自毒物质对其生长、抗氧化酶活力及光合作用的影响。刘苹等[8]研究结果显示,当土壤中自毒物质长链脂肪酸含量达到一定浓度时,对花生植株的生长和土壤酶活性能产生显著地抑制作用。郭亚利等[9]研究表明,烟草根系分泌物能显著降低其幼苗根系活力及对营养元素的吸收,且分泌物的不同组分的抑制效应存在显著差异,推测烟草根系分泌物中含有多种自毒物质。Yeasmin 等[10]在连续移栽系统中以不同轮作方式培养两种芦笋(*Asparagus officinalis* L.),发现所产生的自毒物质(草酸、琥珀酸和酒石酸等)对芦笋根和芽的生长及营养物质(P、N、K、Ca、Mg)的吸收产生不同程度的抑制作用。而环境中的 pH 值降低更易使根细胞膜脂受到伤害[11],Mazzoleni 等[12]认为植物残体对同物种的抑制作用有两种:一种是由残体腐解出的不稳定的自毒物质所产生的非特异性抑制,另一种是由残体的 DNA 发起的特异性抑制。但烟草幼苗期各生长阶段自毒物质的分泌特征及自毒机制尚不明确。本研究拟对两个烟草品种 Burley 及 K326 幼苗期不同生长阶段的根系分泌物进行分离鉴定,并研究主要自毒物质对土培烟草根系中超氧阴离子产生的速率、抗氧化酶活性、脂质过氧化等的影响,从生理生化方面阐明烟草自毒作用可能的生理机制。此研究将对深入研究烟草根系分泌物中自毒物质的作用机理、减弱乃至消除烟草的自毒作用等方面具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试植物

烟草 Burley 和 K326 的种子,由中国烟草总公司郑州烟草研究院提供。

1.2 幼苗期烟草根系分泌物的鉴定

1.2.1 收集根系分泌物

预培养烟草 Burley 及 K326 的种子,出芽后,分别放入装有适量无琼脂 MS 培养基的玻璃培养皿中。无琼脂 MS 培养基成分为:

(1)大量元素 1.65 g NH_4NO_3,1.9 g KNO_3,0.37 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,0.17 g KH_2PO_4,0.44 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$;

(2)微量元素 22.3 mg $MnSO_4 \cdot 4H_2O$,0.83 mg KI,0.025 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$,6.25 mg H_3BO_5,0.025 mg $CoCl \cdot 6H_2O$,8.65 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$,0.25 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$;

铁盐　27.8 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$,37.3 mg Na_2EDTA;

蔗糖 30 g 于 1 L 水中,用 Tris 调节 pH 至 5.70,高压灭菌 20 min[13]。

每个培养皿放入 20 颗,每种烟草设 3 个平行。然后将培养皿放入 22—26 ℃、16 h 光照/8 h 黑暗的光照培养箱中,每天更换 1 次培养基。当幼苗生长至 2 叶龄期、4 叶龄期及 6 叶龄期时,分别将 3 个时期的烟苗从培养皿中的培养基中取出,冲洗干净后,放入去离子水中。分泌 24 h 后再将烟苗放回培养基中,收集含有根系分泌物的去离子水。

1.2.2　pH 值测定

采用 pH 值测定仪(BPH-200D, 上海益伦环境科技有限公司),测定收集烟草幼苗各叶龄期根系分泌物时的培养基 pH 值。

1.2.3　测试样品的制备

取 50 mL 含有烟草幼苗根系分泌物的水样及 100 mL 正己烷,倒入 250 mL 分液漏斗中,振荡 30 min,静置。分层后,将有机相通过装有无水硫酸钠的玻璃漏斗,接入旋转蒸发瓶中。水相再萃取 1 次,有机相转入旋转蒸发瓶,然后于 45 ℃水浴中旋转蒸发至干,正己烷定容至 2 mL,过 0.22 μm 滤膜,经硅烷化处理后于 −20 ℃下保存待测。

1.2.4　GC-MS 检测

检测仪器:气质联用仪 450GC-320MS(Bruker Daltonics Inc., USA)。

色谱条件:DB-5MS 色谱柱(Agilent 19091S-433, HP-5MS, 5% Phenyl Methyl Siloxane,30 m×0.25 mm×0.25 μm,美国安捷伦公司);进样口温度 250 ℃;程序升温:柱温 70 ℃保持 4 min,以 5 ℃/min 升温至 130 ℃,保持 5 min,再以 10 ℃/min 升至 250 ℃,保持 15 min;质谱接口温度为 270 ℃;载气为 He,流速为 1.0 mL/min。

质谱条件:EI 源,−70 eV;扫描范围为 m/z 50—500 amu;扫描时间为 0.5 s;离子源温度为 200 ℃;四级杆温度为 150 ℃;传输线温度 220 ℃。

进样方式:不分流进样,进样量为 1 μL。

与标准质谱谱库 Wiley 7n.L 及 NIST 05.L 比对,确定各种化合物,采用面积归一化法(JY/T003—1996)计算其相对含量。

1.3　邻苯二甲酸酯(PAEs)对烟草根系抗氧化酶活性的影响

将 6 片真叶的 K326 幼苗移栽至直径 11 cm,1.5 L 的瓦盆中,内装有取自河南省郑州市郊土壤(表 1)。每盆中移栽 1 株,随机置于温室中:每天光照 16 h,有效辐射为 320 μmol $m^{-2}s^{-1}$,温度范围为 35 ℃/25 ℃(昼/夜),相对湿度为 60%[14]。在幼苗正常生长后,每星期浇 100 mL 用邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二异辛酯(DIOP)(优级纯,Aladdin 试剂有限公司,中国上海)分别配制 0、0.01、0.1、0.5、1.0、5.0 mmol/L 及 10.0 mmol/L 6 个浓度梯度溶液,浓度参照烟草连作土壤中检测的浓度设置的[15],每个梯度有 3 个重复,连续浇 5 周。然后采集植株根系,洗净、晾干后备用。

表 1　供试土壤的基本理化性质

Table 1　The basic physico-chemical properties of the soil sample

pH	总有机 C Total organic C/(g/kg)	总 N Total N/(g/kg)	总 P Total P/(g/kg)	有效 P Available P/(mg/kg)	总 K Total K/(g/kg)	有效 K Available K/(mg/kg)
7.04±0.08	20.33±0.78	2.63±0.16	0.96±0.11	8.66±0.67	18.2±0.91	96.72±1.06

超氧化物歧化酶(SOD,EC 1.15.1.1)活性测定采用氮蓝四唑法 (NBT)[16],以抑制 NBT 光化还原的 50%为 1 个 SOD 活力单位 (U),用每克酶制剂所具有的酶活力单位数(U/g) 表示 SOD 活性大小;过氧化氢酶(CAT, EC 1.11.1.6)活性采用紫外吸收法测定[17],以 1 min 内 OD240 减少 0.1 的酶量为 1 个酶活力单位(U); 丙二醛(MDA)含量的测定参照 Heath 和 Packer 的方法[18];超氧阴离子(superoxide anion radical, $\cdot O_2^-$)

产生速率可以用羟胺氧化法测得[19]。

1.4 数据分析

采用 SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) 的 One-way ANOVA 分析不同处理之间的差异性(P<0.05)。同一梯度 3 个重复,用于计算平均值和标准偏差。

2 结果

2.1 根系分泌物的鉴定

2.1.1 Burley 幼苗期根系分泌物

Burley 幼苗期根系分泌物主要有 3 类(表 2)。其中 2 叶龄期主要分泌 2 类物质:

(1)烷烃;(2) 邻苯二甲酸酯: 邻苯二甲酸二异丁酯(DIBP)、邻苯二甲酸 3-己基异丁酯。

Burley 4 叶龄期主要分泌 3 类物质:(1)烷烃;(2) 邻苯二甲酸酯: 邻苯二甲酸异丁基壬酯;(3) 2-甲氧基苯酚。

Burley 6 叶龄期主要分泌 2 类物质:(1) 烷烃;(2)邻苯二甲酸酯: 邻苯二甲酸 4-庚基异丁酯。

表 2 Burley 幼苗不同阶段的根系分泌物

Table 2 Root exudates at different stages of Burley seedling

幼苗阶段 Seedling stage	峰 Peak	保留时间 Retention time/min	占总量的百分比 Percentage of total/%	化合物 Chemical compound
Burley 2 叶龄期	1	6,181	3.977	Dodecane 十二烷
Burley two-leaf stage	2	23.868	4.753	邻苯二甲酸 3-己基异丁酯 Phthalic acid, 3-hexyl isobutyl ester
	3	23.85	2.853	邻苯二甲酸二异丁酯(DIBP)1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis (2-methylpropyl) ester
	4	26.617	ND	三十一烷 Hentriacontane
	5	27.166	3.911	三十一烷 Hentriacontane
	6	28.028	6.382	三十一烷 Hentriacontane
	7	28.998	13.855	三十一烷 Hentriacontane
Burley 4 叶龄期	1	8.669	20.248	2-甲氧基苯酚 2-methoxy-Phenol
Burley four-leaf stage	2	23.226	0.346	三十一烷 Hentriacontane
	3	23.876	0.257	邻苯二甲酸异丁基壬酯 Phthalic acid, isobuty nonyl ester
	4	22.065	0.141	3-乙基-3-甲基十九烷 3-Ethyl-3-methylnonadecane
	5	24.306	0.405	3-甲基十一烷 3-methyl-Undecane
	6	25.313	0.973	十九烷 Nonadecane
	7	26.266	2.126	二十四烷 Tetracosane
	8	27.172	6.153	十七烷 Heptadecane
	9	28.041	7.764	二十四烷 Tetracosane
	10	29.003	6.271	三十一烷 Hentriacontane
Burley 6 叶龄期	1	6.172	3.881	2,5,9-甲基癸烷 2,5,9-tnmethyl-Decane
Burley six-leaf stage	2	23.852	ND	邻苯二甲酸 4-庚基异丁酯 Phthalic acid, 4-heptyl isobutyl ester
	3	26.242	2.385	三十一烷 Hentriacontane
	4	27.158	16.182	正二十四烷 Tetracosane
	5	28.027	30.8	二十八烷 Octacosane

ND: not detected

2.1.2 K326 幼苗期根系分泌物

K326 幼苗期根系分泌物主要有 9 类(见表 3)。其中,2 叶龄期根系分泌物中主要含有 7 类物质:(1) 烷烃;(2) 邻苯二甲酸酯:DIOP、邻苯二甲酸二正辛酯(DOP)、邻苯二甲酸丁基环己酯 (BCHP);(3) 二十三烷酸甲酯;(4) 十二烷基-三苯基溴化磷;(5) 1,4-二醇, 2, 3-二甲基-5-三氟甲基苯;(6) 十一丁基亚硫酸酯;(7) 反油酸-苄基二甲硅基脂。

表 3　K326 幼苗不同阶段的根系分泌物

Table 3　Root exudates at different stages of K326 seedling

幼苗阶段 Seedling stage	峰 Peak	保留时间 Retention time/min	占总量的百分比 Percentage of total/%	化合物 Chemical compound
K326 2 叶龄期	1	6.172	ND	2,2,4,10,12,12-六甲基-7-(3,5,5-三甲基乙基己基)十三烷 Tridecane,2,2,4,10,12,12-hexamethyl-7-(3,5,5-trimethylhexyl)
K326 two-leaf stage	2	23.21	0.145	三十一烷 Hentriacontane
	3	23.851	14.519	邻苯二甲酸二异辛酯 Bis(2-ethylhexyl) phthalate ester (DIOP)
	4	24.29	0.218	2,6,10,15-四甲基十七烷 Heptadecane,2,6,10,15-tetramethyl
	5	24.354	0.103	邻苯二甲酸丁基环己 (BCHP) 1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl cyclohexyl ester
	6	25.297	0.454	三十一烷 Hentriacontane
	7	26.251	1.205	三十一烷 Hentriacontane
	8	26.846	1.219	十二烷基-三苯基溴化磷 (10-Carboxydecyl)triphenylphosphonium bromide
	9	27.176	2.455	十一丁基亚硫酸酯 Sulfurous acid,butyl undecyl ester
	10	28.028	0.54	二十四烷 Tetracosane
	11	29.255	20.94	邻苯二甲酸二正辛酯 (DOP)Di-n-octyl phthalate ester
	12	29.511	0.75	1,4-二醇, 2, 3-二甲基-5-三氟甲基苯 Phen-1,4-diol, 2, 3-dimethyl-5-trifluoromethyl
	13	29.602	1.715	反油酸-苄基二甲硅基脂 Elaidic acid,benzyldimethylsilyl ester
	14	29.685	1.996	二十三烷酸 2-甲氧基甲酯 Tricosanoic acid, 2-methoxy-, methyl ester
K326 4 叶龄期	1	6.163	14.199	2,2-二甲基癸烷 2,2-Dimethyloctadecane
K326 four-leaf stage	2	6.172	ND	2,2,4,10,12,12-六甲基-7-(3,5,5-三甲基乙基己基)十三烷 Tridecane,2,2,4,10,12,12-hexamethyl-7-(3,5,5-trimethylhexyl)
	3	21.492	ND	柠檬酸三乙酯 Triethyl citrate
	4	23.854	28.655	邻苯二甲酸二异丁酯(DIBP) 1,2-Benzenedicarboxylic acid,bis(2-methylpropyl) ester
	5	24.349	2.942	邻苯二甲酸丁基环己酯 1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl cyclohexyl ester
	6	24.843	19.678	邻苯二甲酸丁基庚酯 Phthalic acid,butyl 2-heptyl ester
K326 6 叶龄期	1	6.181	1.832	2,5-二甲基壬烷 Nonane,2,5-dimethyl
K326 six-leaf stage	2	23.204	ND	三十一烷 Hentriacontane
	3	23.844	1.139	邻苯二甲酸二丁酯 (DBP)Di-sec-butyl phthalate ester
	4	24.284	1.561	Nonadecane 十九烷
	5	24.843	1.047	邻苯二甲酸丁基己基酯 Phthalic acid, butyl 3-hexyl ester
	6	25.292	3.499	十一丁基亚硫酸酯 Sulfurous acid,butyl undecyl ester
	7	25.283	ND	三十一烷 Hentriacontane
	8	26.255	8.203	三十一烷 Hentriacontane
	9	27.134	20.129	三十一烷 Hentriacontane
	10	28.023	31.508	Tetracosane 二十四烷
	11	28.984	23.91	三十一烷 Hentriacontane
	12	29.909	ND	2-十九烷酮-2,4-二硝基苯肼 2-Nonadecanone 2,4-dinitrophenylhydrazine

ND: not detected

K326 4 叶龄期根系分泌物中主要含有 3 类物质:(1) 烷烃;(2) 邻苯二甲酸酯: DIBP、邻苯二甲酸丁基环己酯、邻苯二甲酸丁基庚酯; (3) 柠檬酸三乙酯。

K326 6 叶龄期主要含有 4 类物质:(1) 烷烃;(2) 邻苯二甲酸酯:DBP、邻苯二甲酸丁基己基酯;(3) 2-十

九烷酮-2,4-二硝基苯肼;(4)十一丁基亚硫酸酯。

常见的自毒物质主要有水溶性有机酸、直链醇、脂肪族醛与酮、简单不饱和内酯、长链脂肪酸与多炔、蒽醌与复合醌、简单酚、苯甲酸及其衍生物、肉桂酸及其衍生物、香豆素类、类黄酮、单宁、类萜及甾类化合物、氨基酸及多肽、生物碱与氰醇、硫化物与芥子油苷、嘌呤及核苷等[20-22]。在 Burley 幼苗期根系分泌物中具有自毒作用的是邻苯二甲酸酯及二甲氧基苯酚。邻苯二甲酸酯在二叶龄期及四叶龄期所占的比率分别为 7.6%及 0.3%,而在六叶龄期未检出邻苯二甲酸酯。在 K326 幼苗期根系分泌物中具有自毒作用的是邻苯二甲酸酯,分别在二叶龄期、四叶龄期、六叶龄期所占的比率为 35.6%、51.3%、2.2% 。具有潜在自毒作用的是烷酸酯、柠檬酸三乙酯等。

2.2　烟草幼苗不同叶龄期培养基 pH 值

烟草幼苗不同叶龄期培养基 pH 值如表 4。本试验用于培养烟草幼苗的 MS 无琼脂培养基 pH 为 5.70。Burley 与 K326 两种烟草幼苗各个叶龄期培养基的 pH 值都比培养前低。两种烟草幼苗随着叶龄期的增加,培养基的 pH 值升高,但都比培养前低。

表 4　Burley 与 K326 幼苗不同叶龄期培养基的 pH 值

Table 4　pH values in the mediums of Burley and K326 in different seedlings stages

类别	Burley			k326		
叶龄期 Leaf stage	二叶龄期 Two-leaf stage	四叶龄期 Four-leaf stage	六叶龄期 Six-leaf stage	二叶龄期 Two-leaf stage	四叶龄期 Four-leaf stage	六叶龄期 Six-leaf stage
培养基 pH 值 pH values in the mediums	2.57±0.32b	2.66±0.17b	3.32±0.19a	2.53±0.09c	2.92±0.11b	3.57±0.22a

表中不同字母表示烟草幼苗不同叶龄期培养基 pH 值在 $P<0.05$ 水平上差异显著,数据为平均值±标准差($n=3$)

2.3　两种肽酸酯对烟草根系抗氧化活性的影响

2.3.1　两种肽酸酯对 $\cdot O_2^-$ 产生速率的影响

随着处理浓度的提高,两种肽酸酯对烟草根系 $\cdot O_2^-$ 产生速率都起着显著($P<0.05$)的促进作用(图 1),相比两种处理影响,DBP>DIOP。两种试剂处理对 $\cdot O_2^-$ 产生速率的影响有显著性差异($P<0.05$)。

2.3.2　两种肽酸酯对 SOD 活性的影响

烟草根系 SOD 活性随着 DBP 浓度的增加而升高。而 SOD 活性随着 DIOP 浓度的增加分别在 0.5 mmol/L 时达到最大,然后随着 DIOP 浓度的增大而降低(图 2)。两种试剂处理对 SOD 活性影响有显著性差异($P<$ 0.05)。

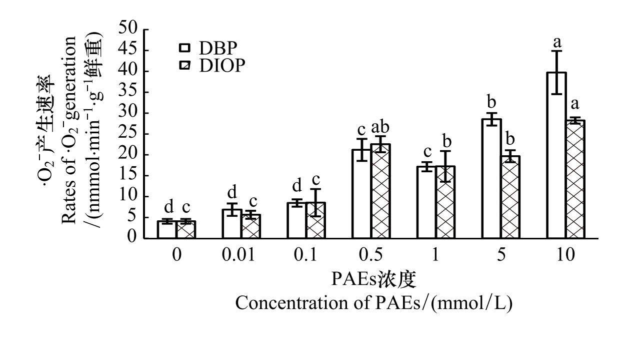


图 1　两种肽酸酯对烟草根系 $\cdot O_2^-$ 产生速率的影响

Fig.1　Effects of two phthalate esters on rates of $\cdot O_2^-$ generation in tobacco roots

图中不同字母表示相同处理不同 PAE 浓度在 $P<0.05$ 水平上差异显著,数据为平均值±标准差($n=3$);DBP:邻苯二甲酸二丁酯 dibutyl phthalate;DIOP:邻苯二甲酸二异辛酯 diisooctyl phthalate

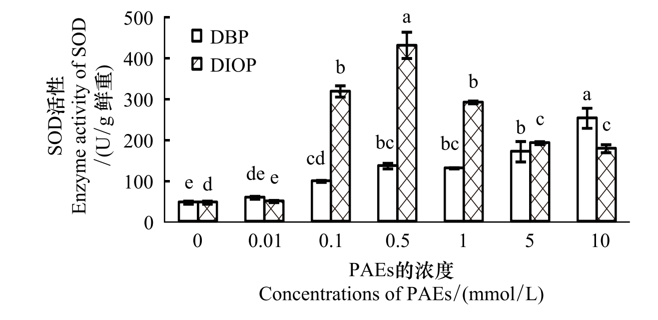


图 2　两种肽酸酯对烟草根系中 SOD 活性的影响

Fig. 2　Effect of two phthalate esters on SOD activity in tobacco roots

图中不同字母表示相同处理不同 PAE 浓度在 $P<0.05$ 水平上差异显著,数据为平均值±标准差($n=3$);DBP:邻苯二甲酸二丁酯 dibutyl phthalate;DIOP:邻苯二甲酸二异辛酯 diisooctyl phthalate

2.3.3　两种肽酸酯对 CAT 活性的影响

烟草根系 CAT 活性随着 DIOP 浓度的增加而急剧升高。可是,随着 DBP 浓度的增加,CAT 的活性在 0.5 mmol/L 时达到最大,然后下降至与对照相似的水平(图 3)。两种试剂处理对 CAT 活性影响有显著性差异(P<0.05)。

2.3.4　两种肽酸酯对烟草根系 MDA 含量的影响

通常以 MDA 浓度表示脂质过氧化水平。与对照相比,两种试剂处理的 6 个浓度都能引起 MDA 浓度的显著变化(P<0.05),MDA 浓度随着处理浓度的提高而增大(图 4)。这和 $\cdot O_2^-$产生速率是一致,因为随着处理浓度的增大,$\cdot O_2^-$产生速率也随之增大。当处理浓度大于 0.5 mmol/L 时,$\cdot O_2^-$产生速率大于根系抗氧化防御体系的清除能力,使 MDA 的浓度显著(P<0.05)增加。相比两种试剂处理对 MDA 浓度的影响程度,DIOP>DBP。但无显著性差异(P<0.05)。

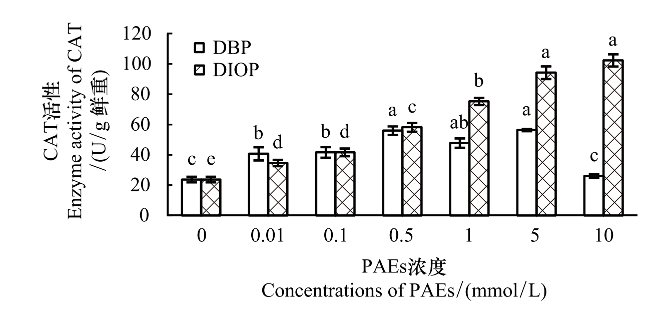


图 3　两种肽酸酯对烟草根系中 CAT 活性的影响

Fig.3　Effects of two phthalate esters on CAT activity in tobacco roots

图中不同字母表示相同处理不同 PAE 浓度在 P<0.05 水平上差异显著,数据为平均值±标准差(n = 3);DBP (dibutyl phthalate):邻苯二甲酸二丁酯;DIOP (diisooctyl phthalate):邻苯二甲酸二异辛酯

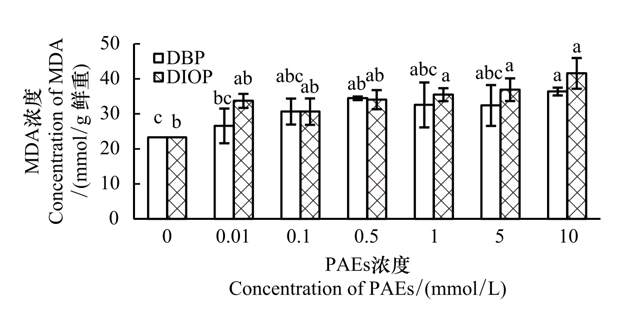


图 4　两种肽酸酯对烟草根系中 MDA 浓度的影响

Fig.4　Effects of two phthalate esters on the concentration of MDA in tobacco roots

图中不同字母表示相同处理不同 PAE 浓度在 P<0.05 水平上差异显著,数据为平均值±标准差(n = 3);DBP:邻苯二甲酸二丁酯 dibutyl phthalate:;DIOP:邻苯二甲酸二异辛酯 diisooctyl phthalate

3　讨论

自毒作用是个体间为了利用有限的资源而进行的一种特殊形式的种内竞争,结果会导致竞争个体适合度的下降,通常表现为密度制约或自疏现象[23]。这将会调解种群数量,使种群由较健康、有活力、更适合周围环境、避免种内竞争的较大个体组成,这样的种群有利于自然选择[24]。

自毒物质主要是通过挥发、淋溶、根系分泌及残体腐解等方式向环境释放[24-25]。而根系分泌物是根系和土壤进行物质、能量交换的重要媒介,是植物产生自毒物质的主要来源之一[26-27]。植物种类、栽培方式及生长阶段等因素能够影响其根系分泌物种类及数量的变化[28-29]。Schumacher 等[30]把野燕麦 (*Avena fatua*) 1 叶龄期、2 叶龄期、3 叶龄期及 4-叶龄期幼苗的根系分泌物,分别加到春小麦 (*Triticum aestivum var.* Fieldwin) 生长的培养基中,发现加入了野燕麦 2 叶龄期、4-叶龄期的分泌物的春小麦,其根和叶的干重显著减少。此试验表明野燕麦在 2 叶龄期及 4-叶龄期分泌的毒性物质较多。Cieśliński 等[31]研究也发现:不同种小麦(Kyle 和 Arcola),在 Sutherland、Waitville 及 Yorkton3 种不同土壤中,其根系分泌低分子量有机酸的量不尽相同,都存在 Yorkton<Waitville<Sutherland 的规律。在本研究中,水培烟草 Burley 和 K326 幼苗不同叶龄期根系分泌物种类及相对含量也是不同的,且都在 2 叶龄期种类最丰富,所分泌的自毒物质 PAEs,在二叶龄期相对含量也最高,并随着幼苗的生长呈现逐渐降低的趋势(表 2,表 3)。

根系分泌的自毒物质主要通过苯丙烷代谢、异戊二烯代谢及生物碱合成等途径产生的次生代谢产物[20]。苯甲酸及其衍生物是常见的自毒物质[21]。烟草幼苗根系所分泌的邻苯二甲酸酯不仅具有自毒作用,同时也是环境内分泌干扰物, 具有激素性作用[32]。当自毒物质达到一定浓度时,能够引起根细胞各种生理功能的改变[33-34],包括活性氧(reactive oxygen species, ROS) 产生速率的变化。在胁迫条件下,ROS 的增加是共同的

或普遍的是特征[35]。细胞的 ROS 有 4 种形式：$\cdot O_2^-$、羟自由基(·OH)、H_2O_2及单线态氧(O^1)。其中$\cdot O_2^-$是生物体中第一个生成的氧自由基,它既能与体内的活性物质直接作用,又能经过一系列反应转化生成·OH、H_2O_2、O^1等其它的氧自由基,具有更大的危害性[36]。本研究在盆栽烟草试验中,由于施加了自毒物质 PAEs,使得烟草根细胞产生$\cdot O_2^-$的速率显著($P<0.05$)增加(图 1)。这与 Papadakis 和 Roubelakis-Angelakis 研究的结果类似[37]。

在正常的生理条件下,烟草根系产生的$\cdot O_2^-$能够被其抗氧化防御系统有效清除。其中起主要作用的是 SOD 和 CAT,SOD 能清除$\cdot O_2^-$使之形成H_2O_2,而H_2O_2随后能被 CAT 和过氧化物酶转化成H_2O[38]。SOD 是细胞防御的第一步[39],是抗氧化防御系统的关键酶[40]。CAT 是细胞胁迫防御必不可少的,能够移除大量的H_2O_2,尤其是在C_3植物中[41]。在本研究中,随着自毒物质 PAEs 处理浓度的增加,烟草幼苗根系中 SOD 和 CAT 活性逐渐增强,但在高浓度下又急剧下降(图 2,3),作物脂质过氧化指标的 MDA 含量也随着两种 PAEs 处理浓度的增大而显著($P<0.05$)增大(图 4)。这种现象的原因可能是:在中等胁迫下烟草根系产生的$\cdot O_2^-$能够被其自身的抗氧化系统有效清除[42-43]。可是在更加严重的胁迫阶段(>0.5 mmol/L),产生速率过快的$\cdot O_2^-$及其产物H_2O_2能使根系抗氧化系统的清除能力达到饱和,过量的$\cdot O_2^-$和H_2O_2一方面能进一步使酶失活[44],另一方面能破坏细胞间巯基,使存在于细胞质膜内磷脂双分子层中的不饱和脂肪酸链氧化分解而造成质膜结构的破坏,造成根尖细胞膜系统的氧化损伤(产物为 MDA),并进一步破坏细胞的内部结构(损伤的细胞也更容易受到有害细菌的侵染)[45]。Ye 等[46]在用 0.05—0.25 mmol/L 的肉桂酸处理黄瓜幼苗作用后也发现:其根系中 SOD 与 CAT 的活性,MDA 与H_2O_2的含量及$\cdot O_2^-$的产生速率随着肉桂酸的浓度增加而显著增加,细胞膜质过氧化加剧,进而黄瓜镰孢霉萎蔫病(*Fusarium wilt*)也加剧了。

值得注意的是,本试验用于培养烟草幼苗的 MS 无琼脂培养基 pH 值为 5.7。在培养烟草幼苗过程中,pH 值普遍降低至 3.0 左右,而且随着幼苗的生长、发育,pH 值有升高的趋势(表 4)。根据 Yu 和 Matsui[47]研究结果,"黄瓜根分泌物中的芳香酸衍生物能抑制黄瓜对NO_3^-、K^+、Mg^{2+}等离子的吸收,pH 的下降能加强抑制作用",可以推测:烟草的自毒作用可能是由于其根系分泌的具有良好的亲脂性的 PAEs 及烟草植物生长介质下降的 pH 值等因素共同促成的。

4 结论

烟草 Burley 及 K326 在幼苗期的不同叶龄期根系分泌物的种类及相对含量是不同的:Burley 幼苗期根系分泌物主要有 3 种,K326 幼苗期根系分泌物主要有 9 种。两种烟草不同叶龄期根系分泌物的种类和相对含量有显著性差别。而且这两种烟草都能产生自毒物质 PAEs,及潜在自毒物质烷酸酯等。在烟草幼苗在生长过程中,所产生的 PAEs 的相对含量逐渐减少。

随着 PAEs 处理浓度的增加,烟草植物根系产生$\cdot O_2^-$的速率逐渐增大,SOD 和 CAT 活性也逐渐增强。但当处理浓度大于 0.5 mmol/L 时,产生$\cdot O_2^-$的速率超过自身抗氧化系统清除能力,造成根尖细胞膜系统的氧化损伤,从而使细胞质膜的通透性增加、离子渗漏增大,造成元素吸收的失衡等一系列生理生化的变化,并最终表现出烟草的自毒作用。

参考文献(References):

[1] Walker T S, Bais H P, Grotewold E, Vivanco J M. Root exudation and rhizosphere biology. Plant Physiology, 2003, 132(1): 44-51.

[2] Xie X N, Kusumoto D, Takeuchi Y, Yoneyama K, Yamada Y, Yoneyama K. 2′-epi-orobanchol and solanacol, two unique strigolactones, germination stimulants for root parasitic weeds, produced by tobacco. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(20): 8067-8072.

[3] 晋艳, 杨宇虹, 段玉琪, 龙玉华, 叶成碧. 烤烟连作对烟叶产量和质量的影响研究初报. 烟草科技, 2002, (1): 41-45.

[4] 邓阳春, 黄建国. 长期连作对烤烟产量和土壤养分的影响. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(4): 840-845.

[5] Weir T L, Park S W, Vivanco J M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. Current Opinion in Plant Biology, 2004, 7(4): 472-479.

[6] Jia Z H, Yi J H, Su Y R, Shen H. Autotoxic substances in the root exudates from continuous tobacco cropping. Allelopathy Journal, 2011, 27(1): 87-96.

[7] Sun Y Y, Jiang G Y, Wei X C, Liu J G. Autotoxicity effects of soils continuously cropped with tomato. Allelopathy Journal, 2011, 28(2): 135-144.

[8] 刘苹, 赵海军, 仲子文, 孙明, 庞亚群, 马征, 万书波. 三种根系分泌脂肪酸对花生生长和土壤酶活性的影响. 生态学报, 2013, 33(11): 3332-3339.

[9] 郭亚利, 李明海, 吴洪田, 袁玲, 黄建国. 烤烟根系分泌物对烤烟幼苗生长和养分吸收的影响. 植物营养与肥料学报, 2007, 13(3): 458-463.

[10] Yeasmin R, Nakamatsu K, Matsumoto H, Motoki S, Nishihara E, Yamamoto S. Inference of allelopathy and autotoxicity to varietal resistance of asparagus (*Asparagus officinalis* L.), Australian Journal of Crop Science, 2014, 8(2): 251-256.

[11] Liu P, Wan S B, Jiang L H, Wang C B, Liu Z H, Zhao H J, Yu S F, Yang L. Autotoxic potential of root exudates of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Allelopathy Journal, 2010, 26(2):197-205.

[12] Mazzoleni S, Bonanomi G, Incerti G, Chiusano M L, Termolino P, Mingo A, Senatore M, Giannino F, Cartenì F, Rietkerk M, Lanzotti V. Inhibitory and toxic effects of extracellular self-DNA in litter: a mechanism for negative plant-soil feedbacks?. New Phytologist, 2015, 205(3): 1195-1210.

[13] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 1962, 15(3): 473-497.

[14] Walch-Liu P, Neumann G, Bangerth F, Engels C. Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. Journal of Experimental Botany, 2000, 51(343): 227-237.

[15] Yi J H, Jia Z H, Lin Q, Lv H Z, Shen H. Allelopathic effects of decaying tobacco leaves on tobacco seedlings. Allelopathy Journal, 2012, 29(1): 51-61.

[16] Dhindsa R S, Matowe W. Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. Journal of Experimental Botany, 1981, 32(1): 79-91.

[17] Beers R F Jr, Sizer I W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. The Journal of Biological Chemistry, 1952, 195(1): 133-140.

[18] Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stochiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1968, 125(1): 189-198.

[19] Elstner E F, Heupel A. Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.). Planta, 1976, 130(2): 175-180.

[20] Tang C S, Takenaka T. Quantitation of a bioactive metabolite in undisturbed rhizosphere-benzyl isothiocyanate From *Carica Papaya* L. Journal of Chemical Ecology, 1983, 9 (8):1247-1253.

[21] Rice E L. Allelopathy. 2nd ed. Orlando, Florida: Academic Press, 1984.

[22] Inderjit. Plant phenolics in allelopathy. The Botanical Review, 1996, 62(2):186-202.

[23] Weller D E. The interspecific size-density relationship among crowded plant stands and its implications for the -3/2 power rule of self-thinning. The American Naturalist. 1989, 133(1): 20-41.

[24] Singh H P, Batish D R, Kohli R K. Autotoxicity: concept, organisms, and ecological significance. Critical Reviews in Plant Sciences, 1999, 18(6): 757-772.

[25] Inderjit, Callaway R M, Vivanco J M. Can plant biochemistry contribute to understanding of invasion ecology? Trends in Plant Science, 2006, 11(12): 574-580.

[26] Kato-Noguchi H. Allelopathic substance in rice root exudates: Rediscovery of momilactone B as an allelochemical. Journal of Plant Physiology, 2004, 161(3): 271-276.

[27] El-Halmouch Y, Benharrat H, Thalouarn P. Effect of root exudates from different tomato genotypes on broomrape (*O. aegyptiaca*) seed germination and tubercle development. Crop Protection, 2006, 25(5): 501-507.

[28] Neumann G, Massonneau A, Martinoia E, Römheld V. Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. Planta, 1999, 208(3): 373-382.

[29] Tyler G, Ström L. Differing organic acid exudation pattern explains calcifuge and acidifuge behaviour of plants. Annals of Botany, 1995, 75(1): 75-78.

[30] Schumacher W J, Thill D C, Lee G A. Allelopathic potential of wild oat (*Avena fatua*) on spring wheat (*Triticum aestivum*) growth. Journal of Chemical Ecology, 1983, 9(8): 1235-1245.

[31] Cieśliński G, van Rees K C J, Szmigielska A M, Krishnamurti G S R, Huang P M. Low-molecular-weight organic acids in rhizosphere soils of durum wheat and their effect on cadmium bioaccumulation. Plant and Soil, 1998, 203(1): 109-117

[32] 屠振力, 钟儒杰. 环境激素邻苯二甲酸丁基苄酯对家蚕生殖的影响. 生态学报, 2014, 34(19): 5470-5476.

[33] Alías J C, Sosa T, Escudero J C, Chaves N. Autotoxicity against germination and seedling emergence in *Cistus ladanifer* L. Plant and Soil, 2006, 282(1/2): 327-332.

[34] Ma Y Q, Jia J N, An Y, Wang Z, Mao J C. Potential of some hybrid maize lines to induce germination of Sunflower Broomrape. Crop Science, 2013, 53(1): 260-270.

[35] Foyer C H, Descourvières P, Kunert K J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. Plant, Cell & Environment, 1994, 17(5): 507-523.

[36] Halliwell B, Gutteridge J M C. Free radicals in biology and medicine. 4th ed. Oxford: Glarendon Press, 1985.

[37] Papadakis A K, Roubelakis-Angelakis K A. The generation of active oxygen species differs in tobacco and grapevine mesophyll protoplasts. Plant Physiology, 1999, 121(1): 197-206.

[38] 邓家军, 胡继伟, 李继新, 苏贤坤, 黄先飞, 刘峰. 重金属离子对烤烟叶片中铜锌超氧化物歧化酶活性的影响. 中国烟草学报, 2010, 16(3): 1-6.

[39] Mobin M, Khan N A. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. Journal of Plant Physiology, 2007, 164(5): 601-610.

[40] Van Camp W, INZÉ D, Van Montagu M. The regulation and function of tobacco superoxide dismutases. Free Radical Biology and Medicine, 1997, 23(3): 515-520.

[41] Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, INZÉ D, Van Camp W. Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defense in C_3 plants. the EMBO Journal, 1997, 16(16): 4806-4816.

[42] Bais H P, Vepachedu R, Gilroy S, Callaway R M, Vivanco J M. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes tospecies interactions. Science, 2003, 301(5638): 1377-1380.

[43] 李志萍, 张文辉, 崔豫川. NaCl 和 Na_2CO_3胁迫对栓皮栎种子萌发及幼苗生长的影响. 生态学报, 2015, 35(3): 742-751.

[44] Foyer C H, Lopez-Delgado H, Dat J F, Scott I M. Hydrogen peroxide-and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. Physiologia Plantarum, 1997, 100(2): 241-254.

[45] Baziramakenga R, Leroux G D, Simard R R. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. Journal of Chemical Ecology, 1995, 21(9): 1271-1285.

[46] Ye S F, Zhou Y H, Sun Y, Zou L Y, Yu J Q. Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots, and promotes incidence of *Fusarium* wilt. Environmental and Experimental Botany, 2006, 56(3): 255-262.

[47] Yu J Q, Matsui Y. Effects of root exudates of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals on ion uptake by cucumber seedlings. Journal of Chemical Ecology, 1997, 23(3): 817-827.